家蚕羧酸酯酶基因 *Bmae35* 的克隆、序列分析及表达

杨 微[1], 齐登伟[2], 余泉友[1,*], 张 泽[1,2]
(1. 重庆大学农学及生命科学研究院, 重庆 400044; 2. 西南大学农业部蚕桑学重点开放实验室, 重庆 400715)

摘要: 昆虫羧酸酯酶是一类能对外源化合物解毒和气味分子降解的重要酶系。本研究选取在家蚕 *Bombyx mori* 幼虫嗅觉感器中有表达, 并与蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides* 触角酯酶基因 *Snon-EST* 可能为直系同源基因的 *Bmae35* 进行克隆和外源表达研究。结果表明: 该基因编码区长 1 581 bp, 共编码 526 个氨基酸。与其他昆虫触角酯酶的多序列比对分析发现, *Bmae35* 编码的蛋白具有酯酶活性必须的催化残基 Ser191, Glu313 和 His429, 也保持着 α-酯酶家族特征基序 Gly-x-Ser-x-Gly。RT-PCR 分析显示, *Bmae35* 在家蚕 5 龄第 3 天各组织中均有表达, 其中在头、脂肪体、马氏管、体壁和丝腺中的表达量较高。*Bmae35* 在雌蛾性信息腺中表达, 并与性信息素合成呈正相关, 暗示其在信息素合成中起重要作用。构建 *Bmae35* 与 pET28(a) 重组载体, 经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导,电泳检测发现该基因以包涵体形式表达, 以镍亲和层析柱纯化, Western blotting 鉴定证实 *Bmae35* 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中正确表达并得以纯化。本实验通过对家蚕 Bmae35 基因的克隆、原核表达与纯化, 为进一步深入研究其表达定位和气味降解等功能奠定基础。

关键词: 家蚕; 羧酸酯酶; 基因克隆; 表达模式; 原核表达; 蛋白免疫印迹
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2011)06-0634-08

Cloning, sequence analysis and expression of carboxylesterase gene *Bmae35* in the silkworm, *Bombyx mori*

YANG Wei[1], QI Deng-Wei[2], YU Quan-You[1,*], ZHANG Ze[1,2] (1. Institute of Agricultural and Life Sciences, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Insect carboxylesterases are important enzymes involved in xenobiotic metabolism and degradation of odorants. In the present study, *Bmae35* gene, which is expressed in larval olfactory tissues of the silkworm and the putative ortholog of antennal esterase *Snon-EST* in *Sesamia nonagrioides*, was cloned and exogenously expressed. Bmae35 comprises a complete coding sequence of 1 581 bp and codes 526 amino acids. The multiple sequence alignment of Bmae35 with other esterases revealed that Bmae35 has the structure characteristics of insect esterases, including the catalytic triad (Ser191, Glu313 and His429) and the conserved pentapeptide Gly-x-Ser-x-Gly in the α-esterase family. Based on the semi-quantitative RT-PCR analysis, the expression pattern of Bmae35 gene showed that it was highly expressed in head, fat body, Malpighian tubules, integument, and silk glands in day-3 5th instar larvae. In addition, the expression of Bmae35 showed a positive correlation with sex pheromone content. The results suggest that *Bmae35* might play important roles in pheromone synthesis. The *Bmae35* gene was sub-cloned into the expression vector pET28(a) and the recombinant protein was obtained by isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. Electrophoresis analysis showed that *Bmae35* was expressed in *Escherichia coli* as inclusion body. The recombinant protein Bmae35 was purified by immobilized Ni^{2+} absorption chromatograph column. Western blotting analysis indicated that Bmae35 was correctly expressed in *E. coli* and purified. The results of this study provide useful data for further understanding the odorant detoxification and expression orientation.

Key words: *Bombyx mori*; carboxylesterase; gene cloning; expression pattern; prokaryotic expression; Western blotting

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目(CDJZR10290002); 国家高技术研究发展计划项目(2006AA10A117)
作者简介: 杨微, 女, 1986 年 8 月生, 湖北随州人, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学与基因工程, E-mail: yangweiwq6413@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yuqy@cqu.edu.cn
收稿日期 Received: 2010-10-21; 接受日期 Accepted: 2011-01-11

羧酸酯酶(carboxylesterases, COEs)是一种广泛分布于动物、植物及细菌的多功能酶系(Satoh and Hosokawa, 1998; Bornscheuer, 2002; Marshall *et al*., 2003)，根据序列相似性和功能特异性，羧酸酯酶可以分为 8 个亚家族：α-酯酶、β-酯酶、保幼激素酯酶、乙酰胆碱酯酶、gliotactins、神经趋化蛋白、神经连接蛋白和 glutactin(Ranson *et al*., 2002)。羧酸酯酶能够有效地催化酯类和酰胺类化合物水解，在降解外源物质的毒性和调节生长发育及神经递质的传递过程中起重要作用(Li *et al*., 2007)，同时它也是昆虫代谢有机磷等杀虫剂的主要解毒酶(Hemingway and Karunaratne, 1998)。羧酸酯酶家族的基因功能高度分化，部分具有水解活性的 α-酯酶或 β-酯酶基因在昆虫触角中表达，能降解性信息素和其他外源气味分子(Vogt, 2005; Tanaka *et al*., 2009)。

研究发现，家蝇 *Musca domestica*、棉蚜 *Aphis gassypii* 等昆虫特定羧酸酯酶基因通过基因复制、突变和表达调控等方式导致酯酶活性增加，从而增强昆虫对有机磷、拟除虫菊酯、氨基甲酸酯等杀虫剂的抗药性(高希武等, 1998; Li *et al*., 2007)。同时 COEs 可能是对植物次生代谢物质解毒的重要酶系。麦长管蚜 *Sitobion avenae* COEs 能被吲哚生物碱芦竹碱(gramine)诱导，其活性与芦竹碱浓度呈正比(Cai *et al*., 2009)。棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和 B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* 等其他昆虫的 COEs 也能被槲皮素(quercetin)、芦丁(rutin)和 2-十三烷酮(2-tridaconone)诱导(高希武等, 1998; 牟少飞等, 2006)。此外，羧酸酯酶参与了昆虫嗅觉信号终止作用。如多音天蚕蛾 *Antheraea polyphemus*、海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis*、意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 等多种昆虫的成虫触角中发现了参与酯类性信息素降解的 COEs(Merlin *et al*., 2007)。Durand 等(2010)首次在海灰翅夜蛾 *S. littoralis* 成虫触角中鉴定发现羧酸酯酶 SlCXE10 能代谢植物绿叶气味物质，从而拓展了对触角中表达的 COEs 功能的认识。

昆虫嗅觉系统是一个高度专一和极其灵敏的化学监测器，在寻找食物和配偶、避免不利环境的伤害、搜寻产卵及生殖场所等方面具有至关重要的作用。因此，不难理解昆虫嗅觉系统中存在大量的解毒酶，从而维持嗅觉的正常生理功能。迄今为止，人们对昆虫嗅觉解毒酶的功能认识仍局限于成虫阶段，而幼虫嗅觉解毒酶的功能还有待进一步的认识。家蚕是一种植食性昆虫，研究家蚕羧酸酯酶对解毒代谢及气味分子降解具有广泛的借鉴性。本研究拟选取家蚕羧酸酯酶家族中的一个基因 *Bmae35*，该基因与蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides* 触角酯酶基因 *Snon-EST* 可能为直系同源基因，家蚕全基因组鉴定和表达模式研究表明该基因在成虫家蚕触角中低表达，而在幼虫嗅觉器官(触角和下颚)中有高表达(Yu *et al*., 2009)，因此，对该基因进行克隆、序列分析，探讨其组织表达模式，以及原核表达与纯化，为进一步研究该基因的组织表达定位和气味降解等功能提供基础。

1　材料和方法

1.1　供试材料

以家蚕大造(P50)为实验材料，按正常条件桑叶饲育，分离 5 龄第 3 天家蚕幼虫的头、体壁、马氏管、丝腺、脂肪体、精巢、卵巢、血淋巴细胞和中肠共 9 个组织，分离羽化后 0 h、羽化后 24 h、雌雄蛾交尾后 3 h、雌雄蛾交尾后 6 h、雌雄蛾交尾后 9 h 这 5 个不同时期雌蛾性信息腺组织，所有组织分别用生理盐水冲洗后储存于液氮中备用。

1.2　RNA 提取

按照操作说明用 TRIZOL Reagent(Invitrogen 公司)提取家蚕各组织的总 RNA，经 Dnase I(RNase Free)处理后用 M-MLV 反转录酶(TaKaRa 公司)反转录得到 cDNA 第一链。

1.3　家蚕 *Bmae35* 基因的表达谱分析

以分离的家蚕各发育时期和组织的 cDNA 为模板，以家蚕 Actin3 基因(GenBank 登录号为 U49854)为内部表达参照，进行半定量 RT-PCR 扩增。*Bmae35* 基因引物为：F1：5′-AGGGCTGAAGAAGATTTACAAG-3′；R1：5′-CGTCTATGTTGAGATACGGTTG-3′。Actin3 基因引物为：F：5′-AACACCCCGTCCTGCTCACTG-3′；R：5′-GGGCGAGACGTGTGTGATTTCCT-3′。反应条件为 15 μL 的扩增体系，94℃ 预变性 4 min，然后 94℃ 变性 45 s、56℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 1 min，共 25 个循环，再 72℃ 延伸 10 min，4℃ 保存。PCR 扩增产物以 1.2% 的琼脂糖胶进行电泳检测。

1.4　家蚕 *Bmae35* 基因的克隆与测序

以 5 龄第 3 天家蚕器官头的 cDNA 为模板，用引物 F2：5′-ATGCATTTAGCGTTTTTTCTGT-3′，R2：5′-CTACGAAAGGATTATATTTTTCATC-3′ 对 *Bmae35*

基因的编码区序列(coding sequence, CDS)进行PCR扩增。PCR反应程序同上,反应体系为25 μL,循环数为30,延伸时间为90 s。PCR扩增产物用胶回收试剂盒进行DNA回收,回收的DNA片段与pEASY-T1(TransGen Biotech公司)载体连接,进行TA克隆,获得阳性克隆送至南京金斯瑞公司测序验证。

1.5 *Bmae35* 原核表达的重组质粒构建

家蚕Bmae35氨基酸序列经Signal IP3.0在线预测信号肽,然后用BioEidt软件分析酶切位点后,设计克隆去除信号肽的编码序列引物,F3: 5′-GGAATTCCATATGTTTGAATATGTTGAATTGAAAACGCGA-3′, R3: 5′-ATAAGAATGCGGCCGCCTACGAAAGGATTATATTTTTCATC-3′(画线部分分别为*Nde* Ⅰ和*Not* Ⅰ酶切位点),PCR扩增和TA克隆方法相同。将重组克隆*Bmae35*/pEASY-T1菌株和pET28(a)空载菌株扩大培养后提取质粒,用限制性内切酶*Nde* Ⅰ和*Not* Ⅰ分别对*Bmae35*/pEASY-T1和pET28(a)进行双酶切,酶切产物以1.2%的琼脂糖进行电泳检测并回收目的条带。回收的线性化pET28(a)表达载体与*Bmae35*目的片段用T4连接酶进行连接,16℃连接过夜,转化至DH5α感受态菌株后,涂布于加有卡那霉素的平板上,培养12~14 h,挑取白色单菌落于LB液体培养基(含卡那霉素)中培养,试剂盒(TransGen Biotech公司)提取重组质粒并送往南京金斯瑞公司测序验证。

1.6 *Bmae35*/pET28(a)的诱导表达

测序正确的重组质粒*Bmae35*/pET28(a)转化至大肠杆菌*Escherichia coli* BL21(DE3)(TransGen Biotech公司)感受态细胞,37℃培养15 h,挑取白色菌落于含有卡那霉素抗性的LB培养基中,37℃ 200 rpm培养至OD_{600}值达到0.6~1.0后,从中取部分样品作为目的基因重组片段的未诱导对照,在剩下的样品中加入IPTG(终浓度1 mmol/L),分别在20℃继续培养6 h。分别离心收集菌体,以0.1 g菌体加入1 mL PBS涡旋后,在冰上操作对菌体进行超声破碎。破碎后4℃ 10 000 rpm离心10 min (MIKRO 220R, Hettich公司)收集裂解上清和沉淀,聚丙烯酰胺凝胶电泳电泳检测目的蛋白的表达。

1.7 家蚕Bmae35重组蛋白的纯化与鉴定

大规模诱导表达菌株,4℃ 10 000 rpm离心15 min收集菌体,按每1 g菌体加入3 mL细胞裂解液重悬菌体,液氮速冻3次后超声破碎,4℃ 10 000 rpm离心10 min收集包涵体沉淀,弃上清。包涵体用不含尿素的结合缓冲液(20 mmol/L磷酸钠,0.5 mol/L氯化钠,30 mmol/L咪唑)洗涤2次,然后用含有8 mol/L尿素的结合缓冲液重悬,冰浴1 h,4℃ 10 000 rpm离心10 min收集上清。将上述提取的包涵体用0.45 μm的滤膜过滤后按照HisTrap镍亲和层析柱(GE Healthcare公司)说明进行蛋白纯化,将纯化所得的目的样品进行SDS-PAGE检测。

纯化的目的样品经SDS-PAGE电泳后,转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉4℃封闭过夜。加入1:10 000稀释的His-tag单克隆抗体,37℃孵育1 h,TBST洗涤3次。加入1:40 000稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)二抗,37℃孵育1 h,TBST洗涤3次。经化学发光试剂(ECL)显色,X-光片感光,验证家蚕Bmae35重组蛋白的表达与纯化。

2 结果与分析

2.1 家蚕羧酸酯酶基因 *Bmae35* 的克隆

以家蚕头cDNA为模板对*Bmae35*基因的完整编码区序列进行RT-PCR扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测出与预期大小一致的目的条带(图1: A),经DNA回收和TA克隆测序,获得了*Bmae35*基因的cDNA序列,该基因编码区长1 581 bp,共编码526个氨基酸(GenBank登录号: HM150791)。cDNA序列与家蚕基因组序列比对发现该基因CDS区含有3个外显子,外显子/内含子边界处均符合GT-AG规则(图1: B)。

2.2 家蚕羧酸酯酶基因 *Bmae35* 的序列分析

利用Signal IP3.0在线预测发现Bmae35可能含有15个氨基酸的信号肽,因此该蛋白可能为分泌蛋白。Bmae35的成熟肽经在线工具(http://ca.expasy.org/tools/)预测得到其分子量为57.3 kDa,等电点为6.39。NetNGlyc 1.0 Server对Bmae35蛋白质序列进行预测,表明其存在5个潜在的N-糖基化位点,分别为N70, N100, N282, N353和N363。

为了解Bmae35与其他昆虫气味降解酯酶及相关COEs的系统发生关系,基于蛋白质序列构建了邻接(neighbor joining)进化树(图2)。进化分析表明,气味降解酯酶属于α-酯酶、β-酯酶和表皮酯酶,其中α-酯酶的成员最多。家蚕*Bmae35*属于α-酯酶家族,与蛀茎夜蛾的触角酯酶基因*Snon-EST*可能为直系同源基因。序列相似性分析表明,

Bmae35 与 Snon-EST 的氨基酸序列一致性为 48.6%，而与 Apol-ODE, Silt-EST, Mbra-EST, Apol-PDE 和 Amel-EST 等气味降解酯酶的氨基酸序列一致性仅为 22.1% ~28.9%，这暗示着不同物种间的气味降解酯酶在底物识别和催化反应中可能有较大的分歧。与其他气味降解酯酶的多序列比对分析发现，Bmae35 具有酯酶活性必须的催化残基 Ser191，Glu313 和 His429，也保持着 α-酯酶/β-酯酶家族的特征基序 Gly-x-Ser-x-Gly（图 3）（Oakeshott *et al.*, 1999）。

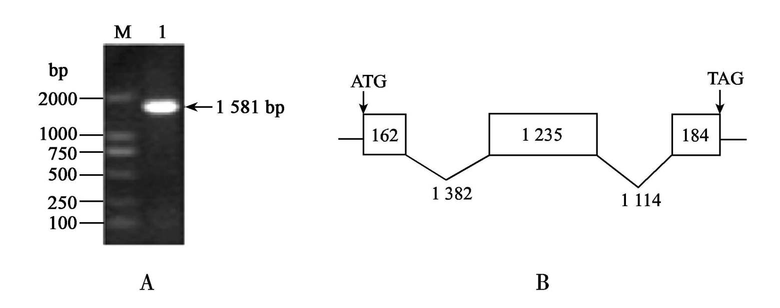


图 1　家蚕 *Bmae35* 基因的 PCR 扩增（A）及结构示意图（B）

Fig. 1　PCR amplification (A) and gene structure (B) of *Bmae35* in the silkworm

M：DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker (DL2000)；1：PCR 扩增的目的片段 Target DNA fragment of PCR amplification. 方框表示外显子，两个外显子之间表示内含子，数字表示外显子和内含子长度(bp)。The boxes denote the exons, the introns lie between these boxes, and the numbers indicate the length of individual exon or intron.

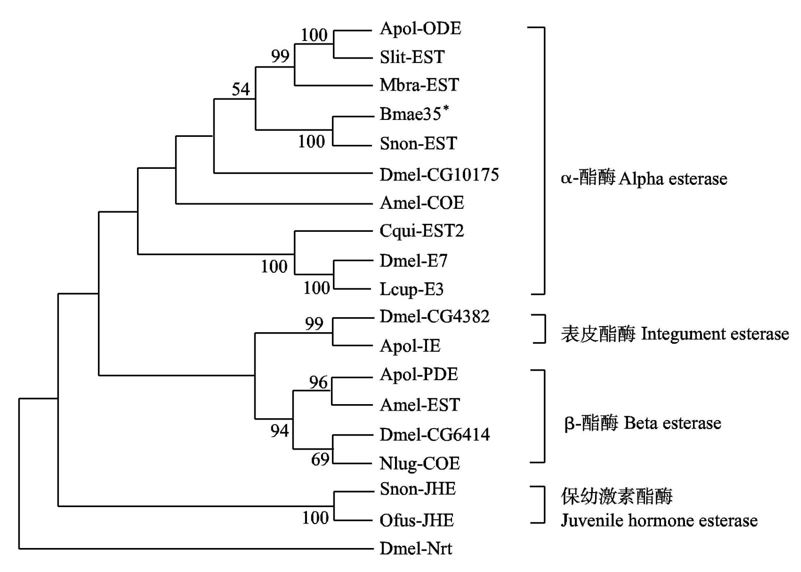


图 2　Bmae35 与其他昆虫羧酸酯酶的系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of Bmae35 and other insect carboxylesterases

分支处的数值是 1 000 次抽样分析支持的百分值 The number close to node is Bootstrap support value by 1 000 replicates. * 家蚕羧酸酯酶 *Bmae35*. 其他昆虫酯酶相关的蛋白序列 GenBank 登录号分别如下 Other insect COEs and their GenBank accession numbers are as follows：Apol-ODE：多音天蚕蛾气味降解酶 *Antheraea polyphemus* odorant-degrading enzyme, AAM14415；Apol-PDE：多音天蚕蛾信息素降解酶 *A. polyphemus* pheromone-degrading enzyme, AY866480；Apol-IE：多音天蚕表皮酯酶 *A. polyphemus* integument esterase, AAM14416；Slit-EST：海灰翅夜蛾触角酯酶 *Spodoptera littoralis* antennal esterase, DQ680828；Mbra-EST：甘蓝夜蛾触角酯酶 *Mamestra brassicae* antennal esterase, AY390258；Snon-EST：蛀茎夜蛾触角酯酶 *Sesamia nonagrioides* antennal esterase, DQ680829；Snon-JHE：蛀茎夜蛾保幼激素 *S. nonagrioides* juvenile hormone esterase, ABW24129；Amel-EST：意大利蜜蜂触角酯酶 *A. mellifera* antennal esterase, AB083009；Amel-COE：意大利蜜蜂羧酸酯酶 *A. mellifera* COE, GB15030；Dmel-E7：黑腹果蝇酯酶 *Drosophila melanogaster* esterase-7, CG1112；Dmel-Nrt：黑腹果蝇神经趋化蛋白 *D. melanogaster* neurotactin, CG9704；Cqui-EST2：致倦库蚊酯酶 *Culex quinquefasciatus* EST2, CAA88030；Lcup-E3：铜绿蝇酯酶 *Lucilia cuprina* E3, AAB67728；Nlug-COE：褐飞虱羧酸酯酶 *Nilaparvata lugens* COE, AF302777；Ofus-JHE：竹蠹螟保幼激素酯酶 *Omphisa fuscidentalis* juvenile hormone esterase, ACB12192.

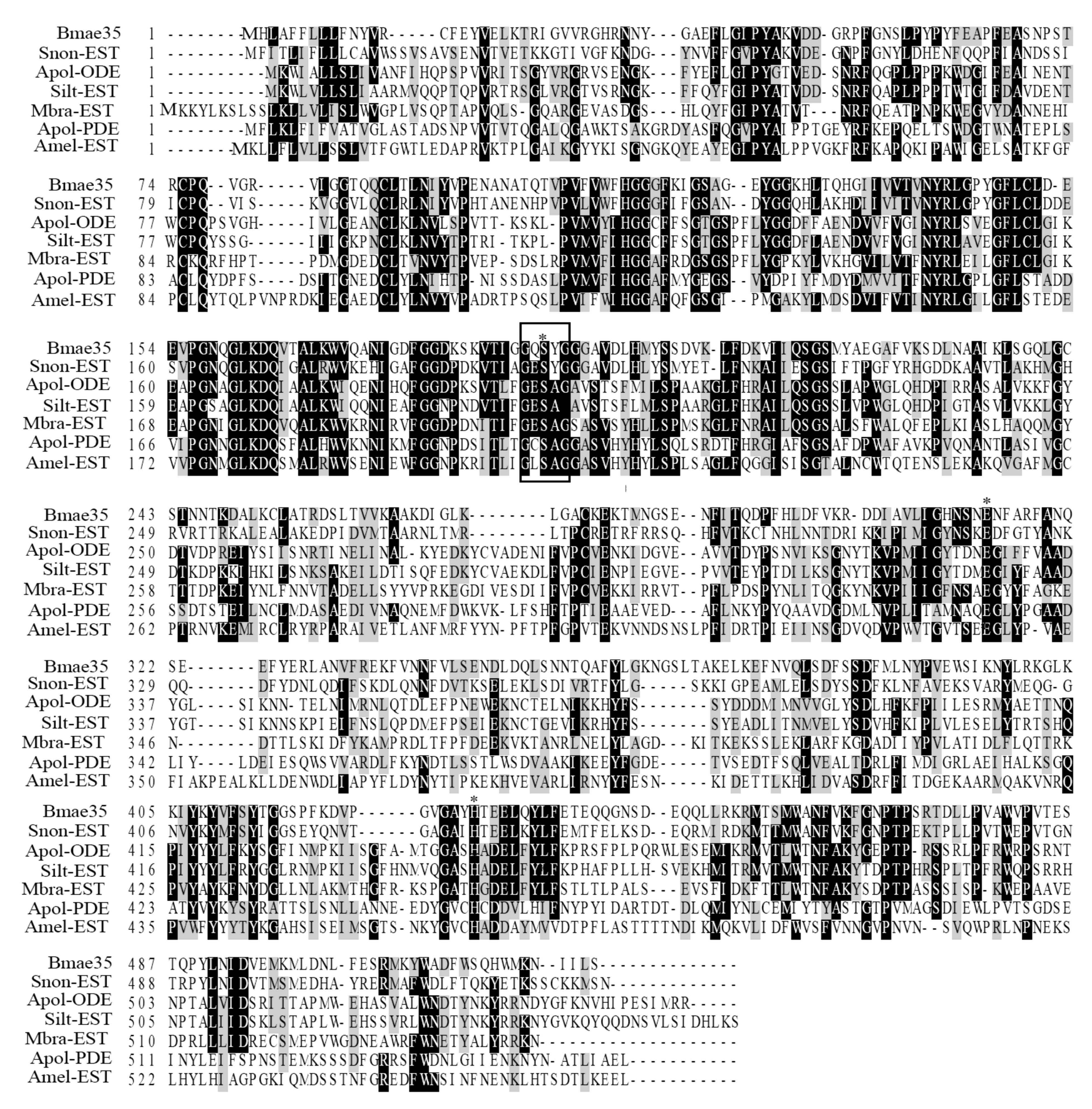


图 3 家蚕 Bmae35 与其他昆虫触角酯酶的比对分析

Fig. 3 Alignment of Bmae35 and antennal esterase in other insects

以 Clustal X 进行多序列比对，然后在 BoxShade（http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html）中标注；黑色阴影表示相同氨基酸，灰色阴影表示相似氨基酸，域值为 0.5；星号代表催化活性位点、方框处代表特征基序。Alignments were done using Clustal X with default parameters and then were shaded using BoxShade with the expected value (0.5). The identical residues are shaded in black, while the similar residues in gray. The catalytic residues are marked with asterisks. A motif of COE was boxed.

2.3 家蚕羧酸酯酶基因 *Bmae35* 的表达模式分析

为了解家蚕羧酸酯酶基因 *Bmae35* 的表达模式，我们首先利用 *Bmae35* 的 CDS 与 NCBI 中的家蚕 ESTs 数据库进行 Blastn 比对，共发现 4 条 ESTs，GenBank 登录号分别为：DC548035，DC546681，DC546289 和 DC536529，前 3 条 ESTs 来源于新羽化的成虫性信息腺（pheromone gland），而 DC536529 则是来源于微生物侵染后的 5 龄幼虫脂肪体。利用半定量 RT-PCR 技术证实 *Bmae35* 基因在家蚕新羽化及羽化后 24 h 的雌蛾性信息腺中有较高的表达，但在雌雄蛾交配后 3 h，6 h 和 9 h 的雌蛾性信息腺中表达量明显降低（图 4：A）。为了解 *Bmae35* 基因在家蚕 5 龄第 3 天不同组织的表达情况，我们以大造的脂肪体等 9 个组织为模板进行 RT-PCR 扩增，结

果表明该基因在所有组织中均有表达，其中在家蚕头、脂肪体、马氏管、体壁和丝腺中的表达相对较高(图 4：B)。

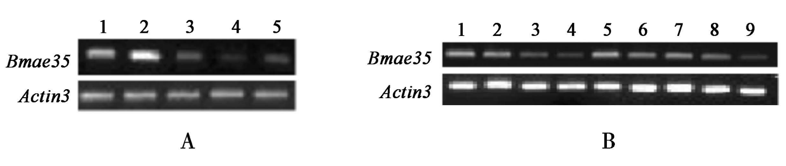


图 4　*Bmae35* 基因在家蚕各组织中的表达分析

Fig. 4　Expression of *Bmae35* in different tissues of the silkworm

A：*Bmae35* 基因在家蚕雌蛾性信息腺的表达 Expression of *Bmae35* in pheromone glands of female silkworm moths at different developmental stages. 1：羽化后 0 h (0 h after emergence)；2：羽化后 24 h(24 h after emergence)；3：雌雄交配后 3 h(3 h after copulation)；4：雌雄交配后 6 h(6 h after copulation)；5：雌雄交配后 9 h(9 h after copulation). B：*Bmae35* 基因在家蚕 5 龄第 3 天各组织的表达模式分析 Expression of *Bmae35* in day-3 5th instar larva. 1：脂肪体 Fat body；2：头 Head；3：中肠 Midgut；4：精巢 Testis；5：马氏管 Malpighian tubules；6：体壁 Integument；7：丝腺 Silk glands；8：卵巢 Ovary；9：血淋巴细胞 Hemocytes.

2.4　家蚕羧酸酯酶基因 *Bmae35* 的重组表达、纯化及鉴定

以去除编码信号肽的核苷酸序列重新设计引物进行 T/A 克隆，测序结果与预期序列一致(1 536 bp)。克隆得到的重组质粒和原核表达载体 pET28(a)进行重组表达质粒 *Bmae35*/pET28(a)构建，经测序证实后转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达菌株，经 1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 收集菌体，聚丙烯酰胺凝胶电泳对表达产物进行检测。重组质粒与空载诱导表达产物显示出了大小约 60 kDa 差异条带。由于目的蛋白分子量约为 57.2 kDa，加上 6 × His 标签序列，约为 60 kDa，因此 *Bmae35* 可能在大肠杆菌中得到了正确表达。表达组分经可溶性鉴定表明目的蛋白主要位于裂解沉淀中，说明该蛋白主要是以包涵体形式表达(图 5：A)。大量收集重组表达菌体，经液氮速冻 3 次后超声破碎，洗涤并提取包涵体。包涵体用镍亲和层析柱纯化，SDS-PAGE 电泳检测表明目的条带单一，纯化的目的蛋白纯度较高(图5：B)。经 Western blotting 检测，结果显示提取的包涵体和纯化的重组蛋白可与 His-tag 抗体产生特异性反应，证实 *Bmae35* 基因得到了正确表达与纯化(图 5：C)。

3　讨论

经 cDNA 克隆，获得了 *Bmae35* 基因的完整编码区序列(1 581 bp)。*Bmae35* 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成，外显子/内含子边界符合 GT-AG 规则。*Bmae35* 共编码 526 个氨基酸，预测表明其含有 15 个氨基酸残基的信号肽，成熟肽分子量为 57.3 kDa。进化分析表明，*Bmae35* 属于 α-酯酶家族，与蛀茎夜蛾的触角酯酶 *Snon-EST* 可能为直系同源基因，两者氨基酸序列一致性为 48.6%。与其他昆虫触角酯酶的多序列比对分析表明 Bmae35 具有水解活性所必须的催化残基 Ser191，Glu313 和 His429，也保持着 α-酯酶/β-酯酶家族的特征基序 Gly-x-Ser-x-Gly(图 3)，推测 Bmae35 可能具有水解酯类化合物的活性。

RT-PCR 分析表明 *Bmae35* 基因在所检测的家蚕 5 龄第 3 天各组织中都有表达，其中在头、脂肪体、马氏管、体壁和丝腺中有较高的表达(图 4：B)。脂肪体和马氏管是昆虫重要的解毒器官，*Bmae35* 在这 2 个组织中有较高表达，推测具有对外源毒性物质解毒的功能。Holmes 等(2008)研究发现 COEs 具有水解酶和乙酸酯合成酶的功能。丝腺是合成和分泌丝蛋白的组织，*Bmae35* 基因在丝腺组织中的高表达表明该基因可能在丝蛋白合成也起着重要作用。进化分析表明 *Bmae35* 基因与蛀茎夜蛾触角酯酶基因 *Snon-EST* 为直系同源基因，后者主要在蛀茎夜蛾的成虫触角中表达，参与酯类性信息素的降解。然而家蚕性信息素为桑蚕醇(bombykol)和桑蚕醛(bombykal)，其中桑蚕醛主要由触角特异的醛氧化酶降解(Kasang *et al*., 1989)。因此，*Bmae35* 与其直系同源基因 *Snon-EST* 在功能上可能发生了一定的分歧。然而家蚕的寄主植物桑叶中含有的顺式-3-己烯乙酸酸［(*Z*)-3-hexenyl acetate］和反式-2-己烯乙酸酯［(*E*)-2-hexenyl acetate］与酯类性信息素结构相似，是引诱家蚕取食的潜在气味物质(Ishida and Leal, 2005；Tanaka *et al*., 2009)，家蚕幼虫头部有众多的化学感受器，对寄主植物气味物质起识别作用。*Bmae35* 基因在家蚕头(图 4：B)及 5 龄第 3 天幼虫触角和下颚中表

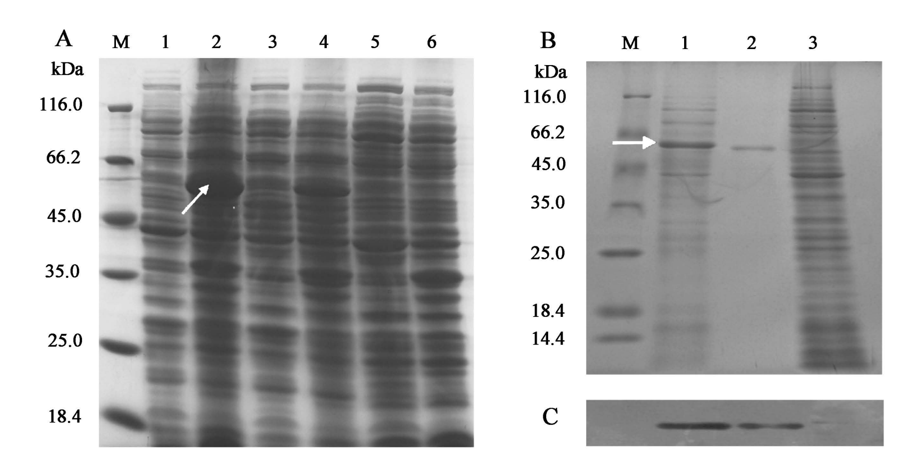


图 5 家蚕 Bmae35 重组蛋白的鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant protein Bmae35

A：家蚕 Bmae35 重组表达蛋白的可溶性鉴定 Dissolubility identification of the expressed protein Bmae35. 箭头表示重组蛋白 Arrow indicates the recombinant protein. M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：*Bmae35*/pET28(a)诱导表达的可溶组分 Dissolved part of *Bmae35*/pET28(a) expressed by induction；2：*Bmae35*/pET28(a)诱导表达的不可溶组分 Non-dissolved part of *Bmae35*/pET28(a) expressed by induction；3：*Bmae35*/pET28(a)未诱导表达的可溶组分 Dissolved part of *Bmae35*/pET28(a) expressed without induction；4：*Bmae35*/pET28(a)未诱导表达的不可溶组分 Non-dissolved part of Bmae35/pET28(a) expressed without induction；5：空载体 pET28(a)诱导的可溶组分 Dissolved part of product of vector pET28(a) by induction；6：空载体 pET28(a)未诱导的产物可溶组分 Dissolved part of product of pET28(a) without induction. B：Bmae35 重组蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析 SDS-PAGE of Bmae35 recombinant protein. C：Bmae35 重组蛋白 Western blotting 杂交鉴定 Western blotting analysis of Bmae35 recombinant protein. 箭头表示重组蛋白 Arrow indicates the recombinant protein；M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：Bmae35 诱导表达的不可溶组分 Inclusion body of Bmae35；2：镍亲和层析柱纯化后的 Bmae35 重组蛋白 Purified protein of Bmae35 by Ni-column；3：空载体 pET28(a) 诱导的不可溶组分 Non-dissolved part of pET28(a) by induction.

达(Yu *et al.*, 2009)。因此，我们推测 *Bmae35* 可能具有降解桑叶挥发性酯类气味分子的功能。

性信息腺是性信息素合成、储存和分泌的场所。研究发现昆虫的性信息素大多数是由脂肪醇被醇氧化酶氧化成相应的醛，或者在乙酰基转移酶作用下生成相应的乙酸酯，这两类物质都是昆虫性信息素的主要成分(王鸿雷等, 2008；Vogel *et al.*, 2010)。家蚕释放出的性信息素是桑蚕醇和桑蚕醛，并没有乙酸酯(Kasang *et al.*, 1978)。Vogel 等(2010)通过 ESTs 分析发现家蚕信息腺中存在乙酰基转移酶和酯酶。因此，乙酸酯可能在家蚕信息腺中能被乙酰基转移酶合成，只是被暂时存储或是被酯酶及时地代谢为相应的醇，而未被作为信息素进行释放(王鸿雷等, 2008)。我们通过 ESTs 分析，发现 *Bmae35* 基因在新羽化的成虫性信息腺中有表达。RT-PCR 证实 *Bmae35* 在羽化初期及羽化后 24 h 的雌蛾性信息腺均有较高的表达，但是在交配 3，6 和 9 h 后其表达量有明显的降低(图 4：A)。Ando 等(1996)研究发现随着家蚕雌雄蛾的交配，性信息素桑蚕醛的合成量将逐渐降低，交配后 6 h 性信息素合成几乎为零。因此，*Bmae35* 的表达与性信息素合成呈一定的关系。推测家蚕信息腺中的 *Bmae35* 基因可能具有将乙酸酯水解为脂肪醇的功能，以调节乙酸酯和脂肪醇含量，从而在家蚕信息素合成中起重要作用。

本研究对家蚕 *Bmae35* 基因进行克隆、表达模式分析，原核表达及 Western blotting 鉴定，初步探讨了该基因可能具有的功能。尚需进一步测定酶活性和利用产生的重组蛋白制备抗体研究该基因的组织表达定位，从而更好地了解这类蛋白质在家蚕体内是如何参与解毒代谢，特别是在幼虫触角中起着降解哪些气味物质的生理功能，为探讨害虫防治新途径提供理论依据。

参 考 文 献 (References)

Ando T, Kasuga K, Yajima Y, Kataoka H, Suzuki A, 1996. Termination of sex pheromone production in mated females of the silkworm moth. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 31(2): 207–218.

Bornscheuer UT, 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26(1): 73–81.

Cai QN, Han Y, Cao YZ, Hu Y, Zhao X, Bi JL, 2009. Detoxification of gramine by the cereal aphid *Sitobion avenae*. *J. Chem. Ecol.*, 35(3): 320–325.

Durand N, Carot-Sans G, Chertemps T, Bozzolan F, Party V, Renou M,

Debernard S, Rosell G, Maïbèche-Coisne M, 2010. Characterization of an antennal carboxylesterase from the pest moth *Spodoptera littoralis* degrading a host plant odorant. *PLoS One*, 5(11): e15026.

Gao XW, Zhao Y, Wang X, Dong XL, Zheng BZ, 1998. Induction of carboxylesterase in *Helicoverpa armigera* by insecticides and plant allelochemicals. *Acta Entomologica Sinica*, 41(1): 5 - 11. [高希武, 赵颖, 王旭, 董向丽, 郑炳宗, 1998. 杀虫药剂和植物次生性物质对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用. 昆虫学报, 41(1): 5 - 11]

Hemingway J, Karunaratne SH, 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med. Vet. Entomol.*, 12(1): 1 - 12.

Holmes RS, Chan J, Cox LA, Murphy WJ, VandeBerg JL, 2008. Opossum carboxylesterases: sequences, phylogeny and evidence for CES gene duplication events predating the marsupial-eutherian common ancestor. *BMC Evol. Biol.*, 8: 54 - 67.

Ishida Y, Leal WS, 2005. Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(39): 14075 - 14079.

Kasang G, Kaissling KE, Vostrowsky O, Bestmann HJ, 1978. Bombykal, a second pheromone component of the silkworm moth *Bombyx mori* L. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 17(1): 60.

Kasang G, Nicholls M, von Proff L, 1989. Sex pheromone conversion and degradation in antennae of the silkworm moth *Bombyx mori* L. *Cell. Mol. Life Sci.*, 45(1): 81 - 87.

Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 231 - 253.

Marshall SD, Putterill JJ, Plummer KM, Newcomb RD, 2003. The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Evol.*, 57(5): 487 - 500.

Merlin C, Rosell G, Carot-Sans G, François MC, Bozzolan F, Pelletier J, Jacquin-Joly E, Guerrero A, Maïbèche-Coisne M, 2007. Antennal esterase cDNAs from two pest moths, *Spodoptera littoralis* and *Sesamia nonagrioides*, potentially involved in odourant degradation. *Insect Mol. Biol.*, 16(1): 73 - 81.

Mu SF, Liang P, Gao XW, 2006. Effects of quercetin on specific activity of carboxylesteras and glutathione S-transferase in *Bemisia tabaci*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(4): 491 - 495. [牟少飞, 梁沛, 高希武, 2006. 槲皮素对 B 型烟粉虱羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶活性的影响. 昆虫知识, 43(4): 491 - 495]

Oakeshott JG, Claudianos C, Russell RJ, Robin GC, 1999. Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *Bioessays*, 21(12): 1031 - 1042.

Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R, 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 298(5591): 179 - 181.

Satoh T, Hosokawa M, 1998. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38(1): 257 - 288.

Tanaka K, Uda Y, Ono Y, Nakagawa T, Suwa M, Yamaoka R, Touhara K, 2009. Highly selective tuning of a silkworm olfactory receptor to a key mulberry leaf volatile. *Curr. Biol.*, 19(11): 881 - 890.

Vogel H, Heidel AJ, Heckel DG, Groot AT, 2010. Transcriptome analysis of the sex pheromone gland of the noctuid moth *Heliothis virescens*. *BMC Genomics*, 11: 29.

Vogt RG, 2005. Molecular basis of pheromone detection in insects. In: Gilbert LI, Iatro K, Gill SS eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology. Vol. 3. Elsevier Press, London. 753 - 804.

Wang HL, Zhao CH, Yan YH, Wang CZ, 2008. A comparative study on the conversion of alcohols and acetates in sex pheromone glands of *Helicoverpa armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(9): 895 - 901. [王鸿雷, 赵成华, 闫云花, 王琛柱, 2008. 棉铃虫和烟青虫性信息素腺体脂肪醇和乙酸酯转化的比较研究. 昆虫学报, 51(9): 895 - 901]

Yu QY, Lu C, Li WL, Xiang ZH, Zhang Z, 2009. Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10: 553.

(责任编辑: 赵利辉)